

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11)

Veröffentlichungsnummer: **0 224 813
A1**

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21)

Anmeldenummer: 86116138.8

(51)

Int. Cl. 4: **C12Q 1/28**, **G01N 33/72**

(22)

Anmeldetag: 21.11.86

(30)

Priorität: 28.11.85 DE 3541979

(43)

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
10.06.87 Patentblatt 87/24

(84)

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71)

Anmelder: **BEHRINGWERKE
Aktiengesellschaft
Postfach 1140
D-3550 Marburg 1(DE)**

(72)

Erfinder: **Pauly, Hans Erwin, Dr.
Finkenstrasse 1
D-3563 Dautphetal(DE)
Erfinder: Schwarz, Herbert
Am Kirtenfeld 3,
D-3557 Ebsdorfergrund(DE)**

(74)

Vertreter: **Meyer-Dulheuer, Karl-Hermann, Dr.
et al
HOECHST Aktiengesellschaft Zentrale
Patentabteilung Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt/Main 80(DE)**

(54)

Mittel zur Bestimmung von Peroxidase-Aktivität mit Stabilisator, Verfahren zur Herstellung und seine Verwendung.

(57)

Es wird ein Mittel zum Nachweis von Peroxidase-oder von Pseudoperoxidase-Aktivität sowie seine Herstellung und seine Verwendung beschrieben. Das Mittel enthält Tetraalkylbenzidin, ein Penicillin oder seine durch saure Hydrolyse erhaltenen Abbauprodukte als Stabilisator, ein Peroxid und Puffersubstanzen.

Das erfindungsgemäße Mittel hat als Peroxidase-Substrat den Vorteil gegenüber bisherigen Tetraalkylbenzidin enthaltenden Substraten, bei Lagerung als Gebrauchslösung stabil zu sein und geringere Hintergrundfärbung zu erzeugen.

EP 0 224 813 A1

Mittel zur Bestimmung von Peroxidase-Aktivität mit Stabilisator, Verfahren zur Herstellung und seine Verwendung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Mittel zur Bestimmung von Peroxidase-Aktivität durch Farbreaktion sowie ein Verfahren zu seiner Herstellung und seine Verwendung.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Einführung von Enzymimmunoassays, die hinsichtlich ihrer Nachweisempfindlichkeit radioimmunologischen Methoden ebenbürtig waren, stellte die Verfügbarkeit von stabilen Markerenzymen und entsprechenden hochempfindlichen Farbbildungsreagenzien dar, mit denen die katalytische Aktivität dieser Markerenzyme in meßtechnisch einfacher Weise zu registrieren war. Als besonders geeignete Markerenzyme erwiesen sich hierbei die Oxidoreductasen Glucoseoxidase und Peroxidase. Peroxidase-Reaktionen gehören generell zu den am häufigsten verwendeten enzymatischen Nachweisreaktionen. Alle z.B. in "Methods of Enzymatic Analysis", H.U. Bergmeyer, Ed., 3. Edition, Vol. 1, pp. 210-221, Verlag Chemie, Weinheim (1983) beschriebenen Verfahren beruhen, wie die Glucose-Bestimmung mittels Glucoseoxidase, auf der stöchiometrischen Erzeugung von Wasserstoffperoxid. Dieses kann dann in einer von Peroxidase katalysierten Oxidation eines farblosen Substrats zu einem farbigen Produkt umgesetzt werden, das einfach spektrophotometrisch quantifiziert werden kann.

Für diese von Peroxidase katalysierte Reaktion geeignete chromogene Systeme sind daher in großer Zahl untersucht und beschrieben (siehe Bergmeyer). Für die Bestimmung von Peroxidase-Aktivität in Enzymimmunoassays erfüllen nur wenige die Anforderungen, insbesondere hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit. Generell sollte ein chromogenes Substrat eine hohe Umsatzgeschwindigkeit erlauben und zu einem farbstabilen Produkt mit einem hohen molaren Extinktionskoeffizienten führen. Weiterhin sollten Substanzen bevorzugt werden, deren Handhabung kein gesundheitliches Risiko birgt. In kommerziellen Testkits für auf Peroxidase basierenden Enzymimmunoassays kommen vor allem o-Phenylendiamin (OPD) und 2,2'-Azinodi-(3-ethylenbenzothiazolinsulfonat-6) (ABTS) zum Einsatz. Sowohl OPD als auch ABTS sind wie die meisten Peroxidase-Substrate mutagen. Eine Gruppe der häufig verwendeten Substrate ist die des Benzidin-Typs, zu der auch Tetramethylbenzidin (TMB) gehört. TMB ist ein sicherer nichtmutagener Ersatz für carcinogene Peroxidase-Substrate des Benzidintyps wie Benzidin, Diaminobenzidin u.a. In zahlreichen Untersuchungen ergab sich kein Hinweis auf mutagene Eigenschaften dieses Benzidinderivats (Tetrahedron 30, 3299 (1976); Cancer Lett. 1, 39 (1975); J. Forensic Sci. 21, 816 (1976). TMB wurde seit 1974 von verschiedenen Anwendern zur Bestimmung der Pseudoperoxidase-Aktivität von Hämoglobin oder Cytochrome P 450 und bereits von Liem et al., Anal. Biochem. 98, 388-393 (1979) zur Detektion von Peroxidase-Aktivität in Immunkomplexen bei der Immunperoxidase-Färbetechnik verwendet. Diese Autoren weisen in ihrer Schlußfolgerung auf Seite 392 auf die guten Färbeeigenschaften, jedoch aber auch auf die geringe Löslichkeit des TMB in üblicherweise verwendeten Puffersystemen und auf die oxidative Zersetzung des TMB hin.

Bei der Verwendung von TMB in Enzymimmunoassays erweist sich jedoch die geringe Wasserlöslichkeit dieses Chromogens unter Testbedingungen als sehr einschränkend. In der Ansatz. Auch in Abwesenheit von Peroxidase bewirkt Wasserstoffperoxid bereits in wenigen Stunden eine Farbbildung, die die Substratlösungen für eine Verwendung im Enzymimmunoassay aufgrund ihres hohen Blindwerts unbrauchbar werden läßt.

Es bestand daher der Bedarf, eine zur Bestimmung von Peroxidase geeignete, Tetraalkylbenzidin enthaltende Zubereitung zu finden, die den oben erwähnten Nachteil nicht hat. Eine solche Zubereitung, ihre Herstellung und ihre Verwendung ist Gegenstand der Erfindung.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß eine hinsichtlich der Stabilität wesentlich verbesserte Zubereitung von Tetraalkylbenzidin erhalten werden kann, indem eine Lösung, die diese Verbindung oder eines ihrer Derivate enthält, mit Penicillin oder mit Penicillinderivaten, die durch saure Hydrolyse des Penicillins entstehen, in einer Konzentration zwischen 2.7 µmol/l und 2.7 mmol/l, vorzugsweise zwischen 13.5 µmol/l und 135 µmol/l versetzt wird und durch Mischen mit einem wässrigen Puffer, der eine geeignete Wasserstoffperoxid-Konzentration enthält, auf einen pH-Wert zwischen pH 2.5 und 6 eingestellt wird. Während Zubereitungen ohne einen solchen Zusatz eine nicht mehr akzeptable Erhöhung des Reagenzienblindwertes innerhalb von einer bis mehreren Stunden zeigen, wird durch den Zusatz von Penicillin oder -derivaten die Haltbarkeit auf eine Dauer von einer bis mehreren Wochen erhöht.

Die Erfindung betrifft deshalb ein Mittel in Form einer flüssigen Zubereitung zum Nachweis und zur Bestimmung von Peroxidase enthaltend in einer überwiegend wässrigen Lösung Tetraalkylbenzidin oder seine Salze, Penicillin oder seine durch schwach saure Hydrolyse aus dem bicyclischen Grundkörper des Penicillins entstehenden Abbauprodukte, beispielsweise Penicillinsäure oder 6-Aminopenicillansäure oder auch das nicht cyclische Penicillamin mit einem Gehalt von 2.7 $\mu\text{mol/l}$ bis 2.7 mmol/l , Peroxide als Substrat für Peroxidase mit einem Gehalt von 0.5 bis 50 mmol/l und Puffersubstanzen.

Das Mittel kann durch Lösen einer festen Zubereitung hergestellt werden, beispielsweise eines Lyophilisats, eines Granulats oder einer Tablette, wobei die für die flüssige Zubereitung verwendeten Komponenten Tetraalkylbenzidin, Penicillin oder dessen Abbauprodukte, die Peroxide und die Puffersubstanzen in den Mengenverhältnissen enthalten sind, daß beim Auflösen in einem bestimmten Volumen vorwiegend wässrigen Lösungsmittels die Komponenten in den genannten Konzentrationen vorliegen. Die feste Zubereitung kann zusätzlich noch Zuschläge wie Gleitmittel, Füllstoffe und Sprengmittel, beispielsweise Polyäthylenglycol, Harnstoff und Bicarbonate enthalten.

Als Tetraalkylbenzidine sind vor allem solche verwendbar, die ein bis drei Kohlenstoffatome im Alkylteil enthalten, vorzugsweise 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) oder sein Dihydrochlorid. Als Penicillin werden vorzugsweise Penicillin G und V verwendet. Als Peroxide sind Natriumperborat, Wasserstoffperoxid in flüssiger Form oder als festes Harnstoffaddukt oder auch ein Wasserstoffperoxid generierendes System bestehend aus D-Glucose und Glucoseoxidase geeignet, wobei eine Konzentration von 0.5 bis 10 mmol/l eingestellt wird. Als Puffersubstanzen werden lyotrope Substanzen wie Citrate und Acetate in Konzentrationen von 5 bis 100 mmol/l bevorzugt.

Bei der Herstellung einer Zubereitung in flüssiger Form wird Tetraalkylbenzidin in einer ersten sauren Lösung von verdünnter Salzsäure oder von Ameisensäure mit einem pH-Wert von 1.5 bis 2.0 gelöst. Vorzugsweise werden das Penicillin oder seine durch saure Hydrolyse entstehenden Abbauprodukte zu dieser Lösung zugesetzt.

Eine zweite, weniger saure Lösung wird hergestellt durch Lösen der Peroxide oder durch deren Eintragen im Falle der Verwendung einer Lösung von Wasserstoffperoxid. Zur Pufferung werden beispielsweise Essigsäure oder Mononatrium-beziehungsweise Monokalium-Citrat, deren pH-Wert mit Natriumhydroxid zwischen 3 und 6 reguliert werden kann, verwendet. Die genannten Abbauprodukte des Penicillins werden dieser zweiten Lösung zugesetzt, wenn diese oder ein Penicillin noch nicht der saureren Lösung zugesetzt worden waren.

Durch Vermischen der beiden Lösungen in einem bestimmten Verhältnis wird die gebrauchsfertige Zubereitung erhalten.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele näher erläutert, ohne sie auf diese zu begrenzen.

Beispiele

1. Herstellung einer gebrauchsfertigen TMB-Substratzubereitung

Stammlösung 1: TMB-Dihydrochlorid wurde unter Rühren in einer Konzentration von 5 g/l , d.h. von 16 mmol/l in bidestilliertem Wasser gelöst und mit 5 normaler Salzsäure auf pH 1.5 eingestellt. Zu dieser Lösung wurde Penicillin G unter Rühren in einer Endkonzentration von 200 mg/l , d.h. von 0.56 mmol/l zugesetzt.

Zum Vergleich wurde Stammlösung 1 ohne Zusatz von Penicillin hergestellt.

Stammlösung 2: zu 900 ml bidestilliertem Wasser wurden 1.4 ml Eisessig, 1.5 ml 1 normale NaOH und 250 mg, d.h. 3 mmol H_2O_2 Harnstoff-Wasserstoffperoxid-Addukt zugesetzt. Nach vollständigem Lösen wurde mit bidestilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Gebrauchslösung: Ein Volumenteil der Stammlösung 1 und 10 Volumenteile der Stammlösung 2 wurden miteinander vermischt.

Diese Lösung zeigte bei 650 nm eine optische Dichte von 0.025. Nach Zusatz des 5-fachen Volumens an 0.5 normaler Schwefelsäure betrug die bei 450 nm gemessene Extinktion 0.008.

2. Haltbarkeitsuntersuchung der Gebrauchslösung

Die TMB-Gebrauchslösung wurde gemäß Beispiel 1 hergestellt und im Kühlschrank bei 4-8° C gelagert. In gleicher Weise wurde eine gebrauchsfertige Lösung gemäß Beispiel 1, jedoch ohne Zusatz von Penicillin G, hergestellt und eingelagert. Nach definierter Lagerdauer wurden Aliquote dieser Gebrauchslösungen entnommen, mit dem 5-fachen Volumen an 0.5 normaler Schwefelsäure versetzt und die Extinktion bei 450 nm (TMB) registriert. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

10

Tabelle

Stabilität der Reagenzienblindwerte von Gebrauchslösungen zur Peroxidase-Bestimmung nach 6-facher Verdünnung mit 0.5 normaler Schwefelsäure

15 Reagenzienblindwerte nach Lagerung bei 4° C für

	0 h	2 h	24 h	48 h	7 d	14 d
20 TMB-Ge-	0.008	0.015	0.006	0.008	0.014	0.024
brauchs-						
25 lösung mit						
Penicillin						
30 TMB-Ge-	0.010	0.038	0.105	0.365	-	-
brauchs-						
lösung ohne						
35 Penicillin						

Ansprüche

40 1. Mittel zum Nachweis und zur Bestimmung von Peroxidase-Aktivität enthaltend ein Tetraalkylbenzidin oder eines seiner Salze, ein Peroxid oder ein Wasserstoffperoxid generierendes System und eine Puffersubstanz, dadurch gekennzeichnet, daß das Mittel Penicillin oder eines seiner durch saure Hydrolyse entstehenden Abbauprodukte enthält.

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Tetraalkylbenzidin ein bis drei Kohlenstoffatome im Alkylteil enthält.

45 3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Tetraalkylbenzidin 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin ist.

4. Verfahren zur Herstellung eines Mittels nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Tetraalkylbenzidin in einer Säure gelöst und ein Penicillin zugesetzt wird und diese Lösung mit einer weiteren Lösung, welche Peroxid und Puffersubstanzen enthält, vermischt wird.

50 5. Verfahren zur Herstellung eines Mittels zum Nachweis und zur Bestimmung von Peroxidase-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß ein Tetraalkylbenzidin oder eines seiner Salze in einer Lösung von pH 1.5 bis 2 gelöst und dieser Lösung ein Penicillin oder ein durch saure Hydrolyse des Penicillins erhaltenes Abbauprodukt in einer Konzentration von 2.7 µmol/l bis 2.7 mmol/l, bezogen auf das Endvolumen, zugesetzt wird und diese Lösung mit einer weiteren Lösung, welche Peroxid und Puffersubstanzen enthält, vermischt wird.

55 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle der Verwendung von Abbauprodukten des Penicillins diese der Lösung zugesetzt werden, welche Peroxid und Puffersubstanzen enthält.

7. Verwendung des Mittels gemäß Anspruch 1 in analytischen Verfahren, in denen Peroxidase-oder Pseudoperoxidase-Aktivität nachgewiesen oder bestimmt wird.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55



EP 86 11 6138

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
X	EP-A-0 121 137 (WARNER-LAMBERT CO.) * Patentansprüche *	1-4	C 12 Q 1/28 G 01 N 33/72
X	--- US-A-4 077 772 (U.C.GEISLER) * Zusammenfassung; Spalten 1,2,3 *	1-5	
A	--- US-A-4 504 579 (MING SUN) * Zusammenfassung *	1,4,5	
A	--- FR-A-2 295 425 (BOEHRINGER MANNHEIM) * Insgesamt *	1-5	
A	--- US-A-4 340 394 (T.A.MAGERS et al.) * Insgesamt *	1-5	RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl. 4) G 12 Q G 01 N
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt.			
Recherchenort DEN HAAG		Abschlußdatum der Recherche 06-02-1987	Prüfer MEYLAERTS H.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument			